

令和 3 年 8 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08656

研究課題名(和文) エピジェネティックマーカーを用いた新しい胃癌洗淨腹水細胞診の開発

研究課題名(英文) Novel diagnosis assay to detect minimally residual disease of gastric cancer using epigenetic DNA markers.

研究代表者

山下 継史 (Yamashita, Keishi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70406932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、胃癌腹水洗淨細胞診の診断能を向上させるため、独自に同定した癌特異的マーカー CD01のメチル化を応用した DNA診断開発研究を行った。400例の腹水洗淨細胞診の検体を収集し、そのうち術前化学療法を受けていない1360例の症例について、DNA診断のポテンシャルについて解析した。CD01メチル化を用いた Q-MSP(通常 PCR)では CY1診断能は ROC=0.80であったが、dd-MSP (digital PCR法を用いた新法)では CY1診断能は ROC=0.93に向上した。次に、HOPXメチル化を組み合わせることで診断能向上を解析したが、あきらかな診断能向上は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により胃癌の腹水洗淨細胞診の感度向上について、最新の PCR技術で達成される可能性が示された。また、特異度は検査としては高い96%を達成しているが、現行の病理検査を凌駕するには至らなかった。今後は、予後の予測など長期の臨床経過観察による臨床的有用性の確認が必要と考えられる。また、遺伝子の組み合わせによりさらなる感度向上には優れた特異度のマーカーを用いる必要があることがわかった(今回選んだ組み合わせマーカーは優れていなかった)。胃癌の診断においては、腹水洗淨細胞診の診断能向上にはDNAメチル化マーカーの使用で達成できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To improve diagnostic capacity of peritoneal fluid cytology test, we are developing novel DNA diagnosis assay using cancer specific alterations of CD01 promoter DNA methylation. In 360 gastric cancer with no prior chemotherapy, diagnostic performance was confirmed to be R=0.80 in conventional Q-MSP, and finally clarified to be R=0.93 in the novel dd-MSP (digital PCR). In combination with other cancer-specific methylation gene (HOPX), we did not confirm improved outcomes.

研究分野：胃癌診断

キーワード：胃癌 腹膜播種 DNAマーカー メチル化 CD01 HOPX

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

われわれは、胃癌において癌組織特異的な DNA メチル化を示す遺伝子として CDO1 (AUC~0.95)(Harada H et al, PLoS One 2019), HOPX (AUC~0.85)(Ooki A, et al, Oncogene 2010), Reprimo (AUC~0.82)(Ooki A, et al, Mol Cancer Res 2013) を独自に同定して報告してきた。そして、それらの結果は残胃癌においても同様であることが明らかになった (CDO1, AUC~0.90, HOPX, AUC~0.77, Reprimo, AUC~0.78)(Kojima K, et al, Oncotarget 2019)。以上から、胃癌においてこれらの遺伝子が癌特異的マーカーとして使用できる可能性が示唆され、胃癌の微量癌細胞検出のツールとしてポテンシャルが高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では癌特異的 DNA マーカーを用いた胃癌腹水洗浄細胞診 DNA 診断の臨床的ポテンシャルを明らかにすることを目的とした研究計画を提案した。胃癌の腹水洗浄細胞診に加えて上記メチル化遺伝子を用いた DNA 診断を同時に評価して、微量癌細胞診断能の現状を知ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

当院における 400 例の胃癌臨床症例 (2016~2019) の微量癌細胞 DNA 診断 (droplet digital MSP) を行い臨床因子との関連を調べた (前向き研究 UMIN000026191)。400 例中 361 例が術前化学療法を行っていない症例の naïve 胃癌症例であり、残りの 39 例は術前化学療法を受けた症例の DNA 診断であった。微量癌細胞の定量は conventional Q-PCR を応用した Q-MSP と digital PCR を用いた droplet digital MSP (dd-MSP)で行った。Primer 配列については、CDO1, HOPX については Q-MSP と同様のもの (Kojima et al, Oncotarget 2019)とを用いたが、Reprimo DD-MSP については新たにデザインした。

4. 研究成果

- (1) CDO1 メチル化を用いた微量癌細胞検出は、通常の real time methylation specific PCR (q-MSP)を用いた洗浄腹水細胞診 DNA 診断 (CY test)において、AUC=0.8 と高い診断能を示すことを報告できた (Harada H, et al. Cancer Sci, 2021)。その報告では、Stage I, Stage II, Stage III, Stage IVCY0, Stage IVCY1 症例における DNA 診断の陽性率は 3.5%, 0%, 4.9%, 35%, 74.2%であり病期の進行と相関していることから高い正診率であることが想定された。Primary endpoint である感度は 74.2%であり特異性は 96.5%であった。この高い特異性のため癌特異的マーカーであることが強く示唆された。また、平均 26 か月と短い観察期間であるにもかかわらず DNA 診断陽性例の予後は不良であり ($p<0.0001$)、CY0DNACY1 症例と CY1DNACY1 症例の予後は同様に不良であった。このことは、CY0 であっても DNACY1 出会った場合腹膜播種を表す微量癌細胞が陽性であった可能性が高いことを示唆する。
- (2) CDO1 遺伝子の q-MSP に加えて dd-MSP による解析結果を追加した。両者は高い相関関係を示したが ($R=0.99, p<0.0001$)、dd-MSP による腹膜播種診断はより高い正確さを示し(AUC=0.93, cut-off 値 0.55)、CDO1 微量癌細胞陽性 (dd-MSP)胃癌はやはり陰性症例に比較して有意に予後不良であった ($p<0.0001$)。特に dd-MSP を用いることで CY1 症例の感度が特異性をそれほど減ずることなく 74.2%から 83.9%まで上昇した。よって、dd-MSP を用いた微量癌細胞 DNA 診断は q-MSP よりも高い感度が期待され

る有望な方法と考えられた。CY1 症例の感度をより上げるためには他の癌特定のマーカーとの組み合わせが必要と考えられたため CDO1 に次ぎメチル化 performance の高い HOPX, Reprimo 遺伝子のメチル化定量解析を追加することとした。

- (3) HOPX 遺伝子の dd-MSP の結果は、CDO1 遺伝子の dd-MSP の結果と強い相関を認め ($R=0.93$, $p<0.0001$)、微量癌細胞の確定性を上げると考えられたが、その相関係数は dd-MSP 値が低値になると低くなった。さらに、HOPX 遺伝子の dd-MSP による腹膜播種診断能は CDO1 遺伝子より低く ($AUC=0.86$, cut-off 値 0,41)、予後の差も弱くなった ($p=0.0003$)。これらの結果は、HOPX 遺伝子メチル化 performance において、最適カットオフ値による特異性の低さを反映していると考えられた。よって、現在 HOPX 遺伝子の特異度を固定して (90%)、感度の再計算とそれに基づく予後解析について解析中である。
- (4) CDO1>16/HOPX>16 の 10 例は全例 CY1 あるいは P1 (病理学的腹膜播種症例) であった。16>CDO1>4/16>HOPX>4 の症例のうち CDO1 陽性症例 7 例は全て病理学的腹膜播種症例であったが、HOPX のみ陽性症例 8 症例中病理学的腹膜播種症例はわずか 1 症例 (CY0P1) であり ($p=0.001$)、CDO1 メチル化検査の特異性の高さを反映していた。微量癌細胞存在 (CDO1) が確定的な症例の予後は検査の有用性を示すと考えられる一方で、HOPX による微量癌細胞診断は適切な特異度を固定してカットオフを決めることによってその有用性が期待される可能性があると考えられた。
- (5) また、Reprimo 遺伝子メチル化 dd-MSP の結果も得られている。Reprimo 遺伝子の dd-MSP の結果は予想通り特異性は高かったが感度は CDO1 より低かった。しかし、CDO1DNACY0 症例の中には ReprimoDHA CY1 で腹膜播種再発を来した症例があり組み合わせ診断のポテンシャルを期待できるものの最終解析は現在進行中である。

結語

dd-MSP 法を用いた CDO1 遺伝子による腹水診断の臨床ポテンシャルは高く有望な癌検出法であると考えられる。今後は、癌特異性の高い遺伝子の組み合わせを模索しより感度・特異度の高い理想的な DNA 診断法を開発していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada Hiroki, Soeno Takafumi, Nishizawa Nobuyuki, Washio Marie, Sakuraya Mikiko, Ushiku Hideki, Niihara Masahiro, Hosoda Kei, Kumamoto Yusuke, Naitoh Takeshi, Sangai Takafumi, Hiki Naoki, Yamashita Keishi	4. 巻 112
2. 論文標題 Prospective study to validate the clinical utility of DNA diagnosis of peritoneal fluid cytology test in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1644 ~ 1654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田 宏輝、山下継史
2. 発表標題 CD01遺伝子メチル化を利用した新規診断法 胃癌DNA腹水洗浄細胞診の確立
3. 学会等名 日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 継史
2. 発表標題 消化器外科領域に応用可能な分子レベルの技術開発 がん特異的DNA markersを用いた"病理学的不可視"がんの可視化による革新的がん医療開発
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------